文章编号:1000-5404(2005)11-1179-02

技术方法

人胎肝来源间充质干细胞的分离培养和鉴定

Isolation, cultivation and identification of nonparenchymal mesenchymal stem cells from fetal liver

何念海,赵文利,王宇明　　(第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提　要: 目的　建立人胎儿肝脏非实质间充质干细胞(nonparenchymal mesenchymal stem cells, NPMSCs)的分离、培养和鉴定方法。**方法**　采用体外细胞分离培养技术,分离培养人胎儿 NPMSCs,用显微摄相、MTT 和图像分析研究其增殖及生长特征,用流式细胞仪和免疫组织化学鉴定其表型。**结果**　每个胎儿肝脏可获得(10 000 ± 2 000)个贴壁细胞,但其中常混有 5% ~ 10%的其它肝非实质细胞,可见 5 ~ 10 个高速增生的细胞集落。原代和传代培养均生长缓慢,按 1 分 3 传代,传 1 代需 8 ~ 10 d,细胞经传代后逐渐纯化,传 10 代后可达到 10^9 个细胞。NPMSCs 不表达 CD34,而表达 CD166。传代 NPMSCs 表达微量 AFP,不表达 ALB。**结论**　肝非实质细胞中含有 NPMSCs,可成为种子细胞。传代培养 NPMSCs 在普通培养条件下不向肝细胞分化。

本研究采用体外细胞分离培养技术,分离培养人胎儿肝脏非实质间充质干细胞(nonparenchymal mesenchymal stem cells, NPMSCs),用显微摄相、MTT 和图像分析研究其增殖及生长特征,用流式细胞仪和免疫组织化学鉴定其表型。

1　材料与方法

1.1　标本

选择 12 例孕期 12 ~ 20 周胎儿,平均孕周为(18.5 ± 4.6)周,胎儿母亲健康,肝功能正常,HBsAg (-),选用米非司酮配伍米索前列腺醇引产,低温保存。均签署知情同意书。

1.2　主要试剂

Ficoll 分离液、特级胎牛血清、牛胰蛋白酶、DMEM/F12 培养基、Ⅳ型胶原酶、二甲基噻唑二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记鼠抗人 CD34、鼠抗人 CD166 单克隆抗体、FITC 结合的小鼠 IgG1κ、鼠抗人 AFP 抗体、兔抗人白蛋白(ALB)抗体、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒。

1.3　实验方法

1.3.1　分离胎肝细胞　　无菌条件下取出肝脏。用前灌液(无钙镁磷酸缓冲液)灌注大鼠肝脏至灰白色;在无菌托盘中用 37 ℃ 0.05% Ⅳ型胶原酶继续灌注,直至肝组织完全软化,肝包膜下组织液化后行钝性撕碎;用眼科镊剥离细胞,至残存网状胆管系组织,收集细胞悬液入无菌瓶,37 ℃水育箱内使胶原酶充分消化细胞团间的胶原组织 10 min 后,3 层无菌纱布滤过大的组织快,滤液即为肝组织细胞悬液。

1.3.2　分离肝非实质细胞　　将肝细胞悬液 50 × g 离心 3 min,沉淀即为肝实质细胞,吸取上清,500 × g 离心 3 min,弃上清,MEM 重悬细胞沉淀。重复上述步骤两次后所得细胞悬液即为肝非实质细胞。

1.3.3　肝非实质细胞中 MSCs 的分离、培养　　将肝非实质细胞悬液叠加到 Ficoll 分离液(1.077 g/L)上,900 × g,20 ℃,离心 20 min,吸取分离液和上清间的细胞层,洗涤 2 次后给予含 10% FBS 的 MEM 培养基重悬细胞,计数,接种入 25 cm^2 培养瓶中,在 CO_2 孵育箱中培养,1 ~ 2 d 后去除未贴壁细胞,观察贴壁细胞的生长特性,1∶3 传代培养。

1.3.4　倒置相差显微镜观察、显微摄像及图像分析　　观察并通过显微摄像记录原代及传代细胞的生长情况和形态变化,采用 Tiger 细胞图像分析仪在细胞图片上测定细胞的面积(At)、最大直径(D_{max})及形态因子(Q)。

1.3.5　NPMSCs 生长曲线测定　　选择 P5 代培养细胞,采用 MTT 法观察细胞生长曲线。

1.3.6　NPMSCs 分裂指数曲线测定　　细胞以 0.5 × 10^4 个细胞/ml 的密度接种于预先放置盖玻片的 24 孔培养板中,每天取出 3 块小玻片,连续 8 d,95%乙醇固定,苏木精染色 10 min,自来水冲洗,常规脱水透明,中性树胶封片。光镜下计数 100 个细胞 × 5 个视野,计算分裂相细胞比例。绘制分裂指数曲线。

1.3.7　流式细胞仪检测 NPMSCs 表型标记 CD166、CD34　　取 P5 代培养的细胞,计数,调整细胞浓度后取两管分别加入 10 μl 抗鼠 IgG1-FITC 和 10 μl 抗人 CD34-FITC McAb,冰上避光,孵育 15 min,另一管加入 10 μl 1∶6.25 稀释抗人 CD166-FITC (80 μg/ml)溶液,冰上孵育 45 min。PBS 洗涤 3 次后加入 1 ml 0.5%多聚甲醛-PBS 溶液固定、重悬细胞,检测。

1.3.8　免疫组化检测 NPMSCs 人 AFP、ALB 的表达及分布

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目("863"项目)(2001AA216161)
Supported by the National "863" High Sci & Tech Research Project of China (2001AA216161)

作者简介:何念海(1965 -),男,四川省遂宁市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事生物人工肝及相关基础方面的研究,现在儿科。电话:(023)68754413
通讯作者:王宇明,电话:(023)68754141

收稿日期:2004-04-15;**修回日期**:2004-10-22

将P5代培养的细胞在消化后以$4\times10^4/cm^2$接种于爬片上。按SABC免疫组化试剂盒操作说明书进行检测。

1.4 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验。

2 结果

2.1 细胞收获

培养1 d后换液,平均每个胎肝中可获得(10 000±2 000)个贴壁细胞,其中常混有5%~10%其它肝脏非实质细胞,可见5~10个高速增生的细胞集落。

2.2 细胞形态学特点

原代细胞生长相对缓慢,刚分离的细胞大小不甚均匀,呈多角形,核为卵圆形或圆球形,胞浆较少。接种于培养瓶中1~2 h后细胞开始贴壁并伸展,12 h后细胞增殖明显活跃,细胞体积有所增大,细胞形态呈不规则多边或多角形,细胞间隙逐渐缩小,漩涡样或火焰样生长,显示了成纤维细胞生长特点。5~7 d后细胞相互接触,布满视野。按随机表法选择30个MSCs,经细胞图像分析其平均最大直径为(65.3±14.3)μm,细胞面积(1 065.2±198.4)μm^2,形状因子为(3.9±1.4)(与刚分离细胞相比,$P>0.05$)。

2.3 传代培养

按1:3传代,每2天换1次液,细胞基本需8~10 d相互接触,长满后传代,经传代后逐渐纯化,传10代后可达到10^9个细胞,同时细胞形态逐渐老化。此后,培养液中漂浮细胞逐渐增多,细胞轮廓欠清晰,培养液中可见黑色颗粒状物质,直至最后大部分细胞开始崩解,与瓶壁脱离。

2.4 传代细胞生长曲线和分裂指数曲线

传BT代培养的潜伏期为28~72 h,对数增殖期为2~3 d,对数增殖期后至接种后第6天进入平台期。细胞分裂指数曲线的趋势与生长曲线基本类似,在达到对数生长期后,分裂相的细胞逐渐减少。

2.5 NPMSCs的表型特征

流式细胞术显示NPMSCs中CD166表达阳性细胞比例为96.00%;CD34表达阳性细胞比例为5.26%。

2.6 免疫组化检测NPMSCs人AFP、ALB的表达

对P5代培养细胞表达微弱的AFP,不表达ALB。

3 讨论

不少学者致力于研究肝间充质干细胞的分离与培养方法,原因是它不仅是对体内研究的必要补充,而且可藉此开辟通过肝细胞移植进行临床治疗的途径。Brill等[1]使用含二甲亚砜(DMSO)激素限定培养液建立了鼠原代胎肝细胞长期培养方法,发现了两类肝祖细胞。

目前使用较多的方法是利用FACS分离肝干/祖细胞[2~4]。我们根据肝间充质干细胞体积小、质量轻、从本质上属于非实质细胞这一原理,采用两步法分离肝间充质干细胞。第一步将肝实质细胞与肝非实质细胞分开,第二步再将肝间充质干细胞与其它肝非实质细胞分开。首先采用$50\times g$的离心力将肝实质细胞分离出去,然后再采用$500\times g$的离心力将非实质细胞沉淀,将肝非实质细胞悬液叠加到Ficoll分离液上,$900\times g$离心,吸取分离液和上清间的细胞层,即为肝间充质干细胞层。这种方法大大简化了操作程序,分离效果也较为满意,所获得的细胞数及细胞活性都比较理想。

NPMSCs不表达血细胞及内皮细胞的抗原。其特点是:不表达CD34、Thy-1和c-Kit、CD45和HLA-DR,而只表达CD29、CD44、CD105、CD147、CD166等基质细胞和间充质干细胞的特异性表面标志,尤其是CD105和CD166已作为MSCs的特征性标志[5~7]。用流式细胞术分析本研究中分离传代第5代人胎儿NPMSCs符合间充质干细胞特征。

传代NPMSCs表达微量AFP,不表达ALB,表明传代培养NPMSCs在普通培养条件下不向类肝细胞分化。

所获成分中有一部分细胞在形态学上不符合肝间充质干细胞特征,可能是其它肝非实质细胞。这一问题将在今后的研究中不断总结和改进,以进一步完善操作程序及分离效果,使其具有进一步推广应用价值。

关键词:肝非实质间充质干细胞;分离;培养;鉴定
中图法分类号:R329.2 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Brill S, Zvibel I, Reid L M. Expansion conditions for early hepatic progenitor cells from embryonal and neonatal rat livers [J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(2): 364-371.

[2] Taniguchi H, Suzuki A. Identification and enrichment of hepatic stem cells by flow cytometric cell sorting [J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2000, 45(13 Suppl): 2250-2256.

[3] Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, *et al*. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver [J]. Hepatology, 2000, 32(6): 1230-1239.

[4] Taniguchi H, Suzuki A, Zheng Y, *et al*. Usefulness of flow-cytometric cell sorting for enrichment of hepatic stem and progenitor cells in the liver[J]. Transplant Proc, 2000, 32(2): 249-251.

[5] 郭子宽, 唐佩弦, 刘晓丹. 人骨髓来源的间充质干细胞体外支持造血的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2000, 8(2): 93-95.

[6] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science, 1997, 276(5309): 71-74.

[7] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al*. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57-66.

(编辑 刘洪娥)